

猪肉中有机氯农药多组分的顶空固相微萃取 - 气相色谱 - 质谱检测技术初探

施致雄^{1,2} 杨欣² 封锦芳¹ 肖忠新¹ 吴永宁²

(1. 首都医科大学公共卫生与家庭医学学院,北京 100069;
2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:目的 探讨建立顶空固相微萃取快速测定有机氯农药残留方法。方法 以稳定性同位素¹³C₆-六氯苯和¹³C₁₀-灭蚁灵为内标,以顶空固相微萃取作为猪肉样品的前处理手段,采用气相色谱-质谱的选择离子模式(SIM)测定猪肉样品中18种有机氯农药组分。通过对萃取头类型、萃取时间、萃取温度、解析温度和时间、盐溶液的浓度等影响萃取效率的因素的研究,获得了优化的试验参数。结果 在给定条件下,方法线性范围在1~100 ng/kg范围内,混和标准溶液的加标回收率在90%~120%之间,相对标准偏差在3%~15%之间。结论 本方法适合于猪肉样品中的有机氯农药多残留的快速检测,为农药残留的筛选提供了有效的监测手段。

关键词:固相微萃取;同位素;农药;杀虫药;有机氯;猪;肉

疾病暴发有上升趋势。生肉类、水产类食品中病原菌分离率最高;沙门菌分离株的耐药性应引起关注。
3.3 本研究分析了我国食品中主要化学性和微生物性危害的污染状况及食源性疾病的流行趋势,为进一步强化食品安全控制措施,科学制修订食品卫生法规和标准提供了重要科学依据。

参考文献

- [1] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 3-9.
- [2] 王竹天. 食品污染物监测及其健康影响评价的研究简介[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(2): 99-103.
- [3] 中疾控食便函[2004]15号. 关于寄发2004年全国食品污染物监测网 食源性疾病预防网协作组会议纪要的函[Z]. 2004-05-11.
- [4] 王竹天, 蒋定国, 杨大进, 等. 2003年~2004年我国食品添加剂监测结果与分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(2): 99-103.
- [5] 蒋定国, 方从容, 杨大进, 等. 测定茶叶中27种有机氯和拟除虫菊酯农药多残留分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(5): 385-389.
- [6] 中疾控食便函[2005]77号. 关于寄发2005年全国食品污染物监测网 食源性疾病预防网协作组会议纪要的通知[Z]. 2004-05-21.
- [7] 卫监督发[2005]244号. 卫生部关于印发2005年全国食品污染物和食源性疾病预防计划的通知[Z]. 2005-06-14.
- [8] 刘秀梅, 陈艳, 樊永祥, 等. 2003年国家食源性疾病预防网报告资料分析[J]. 卫生研究, 2006, 35(2): 201-204.
- [9] 郭云昌, 刘秀梅. 市售鸡肉中沙门菌分离株多重耐药谱测定[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 100-103.
- [10] 刘秀梅, 程苏云, 陈艳, 等. 2003年中国部分沿海地区零售海产品中副溶血弧菌污染状况的主动监测[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 97-99.
- [11] 陈艳, 刘秀梅. 福建省零售生食牡蛎中副溶血性弧菌的定量危险性评估[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(2): 103-107.

[收稿日期: 2006-09-29]

中图分类号: R15; X836 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2006)06-0491-07

基金项目: 国家“十五”科技攻关重大项目(2001BA804A19和2001BA804A45)

作者简介: 施致雄 男 助教 在职博士生

通讯作者: 吴永宁 男 研究员 博士生导师

Headspace Solid-phase Microextraction Combines with Gas Chromatography Mass Spectrometry for Determination of Organochlorine Pesticides in Pork Sample

SHI Zhi-xiong, YANG Xin, FENG Jing-fang, XIAO Zhong-xin, WU Yong-ning

(School of Public Health and Family Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) was used as a clean-up and pre-concentration procedure for the simultaneous determination of organochlorine pesticides (OCPs) in pork samples. **Method** Two stable isotopic compounds, ^{13}C labeled mirex and ^{13}C labeled hexachlorobenzene, were used as internal standard. Gas chromatographic analysis with mass spectrometry (GC-MS) facilitates sensitive detection of the selected pesticides. Several parameters controlling SPME were studied and optimised: choice of SPME fiber, extraction temperature, extraction time, desorption time, desorption temperature and content of salt. **Result** Under optimal conditions, detection limits obtained were in the range of 1 to 100 ng/g depending on pesticide. Good recoveries (range from 90% to 120% in most cases) were achieved. **Conclusion** The result showed that the HS-SPME/GC-MS method is suitable for the analysis of multi-residue OCPs in pork sample.

Key word: Headspace Solid-phase Microextraction; Isotopes; Insecticides, Organochlorine; Swine; Meat

有机氯农药为惰性和相对非极性化合物,具有挥发或半挥发性,无需衍生,可采用气相色谱-电子捕获检测器进行特异性检测,其样品的前处理常采用固液萃取、液液萃取以及硫酸或凝胶渗透色谱技术净化,需要消耗大量有机溶剂,操作繁琐,耗时费力。固相微萃取(Solid phase microextraction, SPME)是20世纪90年代发展起来的一种简便、快捷、不使用有机溶剂的样品制备及前处理技术,集萃取、浓缩、进样为一体,克服了传统样品前处理技术的缺点^[1]。已有将SPME技术用于植物性食物、生物体液等多种基质样品中农药多残留检测的文献报道^[2-4],但关于动物性食物中有机氯农药多残留检测的相关报道较少见。为提高有机氯农药残留的检测速度,本文以《斯德哥尔摩公约》规定的有机氯农药为主要目标化合物,以猪肉为样品基质,进行了顶空固相微萃取-气相色谱-质谱检测技术的初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

有机氯农药标准品 纯度 99.0% (美国 Sigma 公司)、 $^{13}\text{C}_{10}$ -灭蚊灵和 $^{13}\text{C}_6$ -六氯苯纯度 99.0% (加拿大 Wellington Laboratory)、正己烷 农残级 (英国 Fisher 公司)、氯化钠 分析纯 (北京化学试剂公司)。

1.2 标准品配制

标准储备液 分别准确称取一定量标准品或同位素内标于 10 ml 容量瓶中,用少量苯溶解,加正己烷定容至刻度,制得单标的储备液, - 20 保存。

混合标准应用液 量取适量单标储备液,混和并用正己烷稀释,制得混合标准应用液, - 4 保存。应用液中各农药组分浓度为: -六六六、-六六六、-六六六和 -六六六均为 750 $\mu\text{g/L}$ 、六氯苯 832

$\mu\text{g/L}$ 、五氯硝基苯 806 $\mu\text{g/L}$ 、七氯 808 $\mu\text{g/L}$ 、艾氏剂 1 080 $\mu\text{g/L}$ 、环氧七氯 808 $\mu\text{g/L}$ 、氧氯丹、反式氯丹和顺式氯丹均为 800 $\mu\text{g/L}$ 、狄氏剂 775 $\mu\text{g/L}$ 、灭蚊灵 800 $\mu\text{g/L}$ 、*p, p'*-DDE、*p, p'*-DDD、*o, p'*-DDT 和 *p, p'*-DDT 均为 1 000 $\mu\text{g/L}$ 。

内标应用液中 2 种内标 $^{13}\text{C}_{10}$ -灭蚊灵和 $^{13}\text{C}_{10}$ -六氯苯浓度均为 6 mg/L,正己烷配制, - 4 保存。

1.3 仪器和设备

QP2010 气相色谱-质谱联用仪 (日本岛津公司)、色谱柱: HP-5MS 石英毛细管柱 30 m \times 0.25 mm i. d. \times 0.25 μm (美国 Agilent 公司)、Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。SPME 手柄及萃取头 (美国 Supelco 公司),选用聚丙烯酸酯 (PA, 85 μm) 和二乙烯苯/碳烯/聚二甲甲基硅氧烷 (DVB/CAR/PDMS, 50/30 μm) 2 种萃取头。

1.4 样品处理

空白猪肉样品由中国疾病预防控制中心营养与食品安全所提供。待测样品及空白样品均用高速匀浆机制成匀浆并存储于 - 20 备用,用前于 4 解冻。

取 1 个 20 ml SPME 萃取专用样品瓶,准确加入 1 g 空白肉样的匀浆、一定量的农药混合应用液和 10 μl 内标液,混匀,再加入 5 ml 超纯水,0.5 g 氯化钠和磁力搅拌子,用带有聚四氟乙烯隔垫的盖子密封,振荡器上振荡 1 min 后置于带磁力搅拌器的水浴中加热,搅拌速度 500 r/min。随后将萃取针管刺透隔垫进入瓶中萃取头第一次使用前先在气相色谱仪进样口中 270 活化 1 h,伸出萃取头,保持萃取头在液面上顶空萃取样品,水浴 60 萃取 30 min 后收回萃取头,将萃取针管插入 GC 进样口中,再次伸出萃取头于 240 热解析 7 min,进行定性和定量分析。

取 6 个 20 ml 萃取瓶,分别加入 1 g 空白肉样匀

浆、一定量混合标准应用液和10 μ l内标液,混匀,再加入5 ml超纯水、0.5 g氯化钠制得系列加标样品溶液,各瓶中加入的应用液分别为 2、5、10、20、40、100 μ l。萃取方式同样品操作。

1.5 测定

1.5.1 色谱条件 进样口温度240 ;载气为高纯氦气,流量1.0 ml/min (37.1 cm/s);柱温箱在100 时柱前压为 10.6 p. s. i。检测过程采用程序升温:初始温度50 ,保持1 min,以 30 /min升温至150 ,再以5 /min升温至185 ,最后以 10 /min升温至280 ,保持7 min,总程序时间 27.83 min;不分流进样。

1.5.2 质谱条件 离子源温度220 ,电子轰击(ED)离子源,电子能量70 eV,接口温度200 。以全扫描模式(scan mode)确定各农药组分及内标物的保留时间并确定各农药组分及内标的定量离子,质量扫描范围 50 ~ 500 质量单位。定量分析时采用选择离子模式(SIM)检测,以峰面积定量。

1.5.3 测定 根据各被测物的保留时间,将¹³C₁₀-六氯苯作为 δ -六六六、 γ -六六六、 β -六六六、 α -六六六、六氯苯、五氯硝基苯、七氯、环氧七氯、氧氯丹、艾氏剂、反式氯丹和顺式氯丹的内标,¹³C₁₀-灭蚁灵作为 *p,p'*-DDE、狄氏剂、*p,p'*-DDD、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT和灭蚁灵的内标。记录被测物与

相应内标物的峰面积,计算被测物与相应内标物的峰面积比。以各系列加标样品溶液的浓度与对应的被测组分和内标的峰面积比进行线性回归计算,得出线性方程并以此计算试样中被测物含量。

2 结果与分析

2.1 SPME 条件优化

2.1.1 萃取头的选择 商品化的萃取头涂层材料主要有聚丙烯酸酯(PA)、二乙烯苯/碳烯/聚二甲基硅氧烷(DVB/CAR/PDMS)和聚二甲基硅氧烷(PDMS)等,其中聚二甲基硅氧烷(PDMS)涂层极性较低,不适用于相对极性较大的有机氯农药的萃取,因此实验中只采用 PA 萃取头和 DVB/CAR/PDMS 萃取头进行比较。分别以这两种萃取头对加标样品进行处理并进样测定,加标样品中含1 g空白样品匀浆、5 ml水、20 μ l混合标准应用液、10 μ l内标应用液。萃取温度60 ,萃取时间40 min,解析温度240 ,解析时间5 min。两者的比较如图1所示,结果表明,对所有被测有机氯农药,PA 的响应值均高于 DVB/CAR/PDMS,这是因为 PA 涂层含有极性较强的酯基,更适合极性较大的有机氯农药的萃取。另外,聚丙烯酸酯涂层中含有非极性的烷基链,即使对极性较低的化合物也会有很好的吸附,为此本实验选用 PA 为其萃取头。

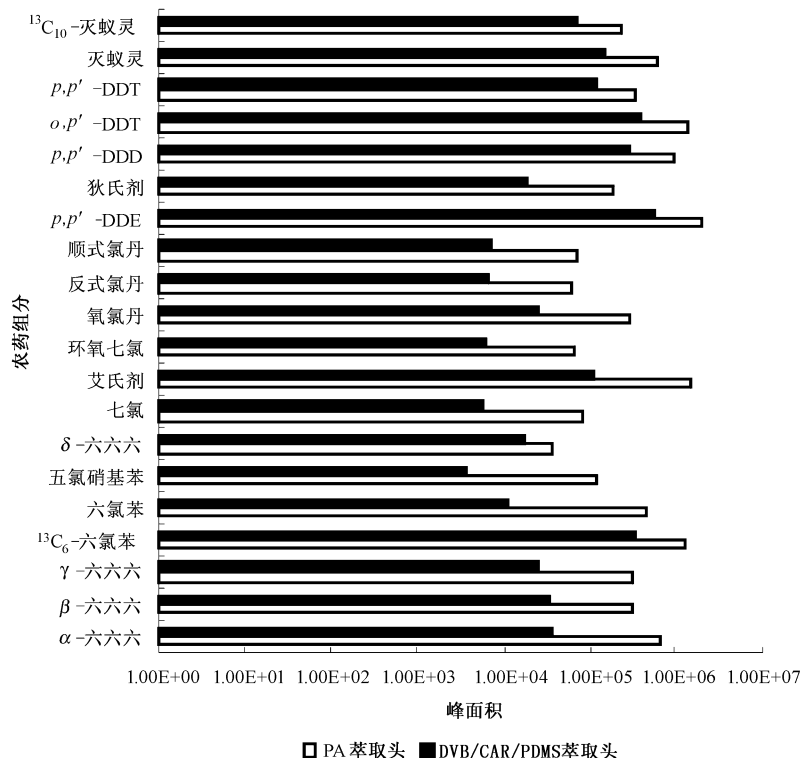


图1 PA 与 DVB/CAR/PDMS 萃取头萃取效率(以峰面积表示)比较

2.1.2 萃取温度 温度在 HS - SPME 中起着重要作用,温度变化在热力学上将引起待测有机物固 - 气 - 液三相平衡常数的改变,从而影响分析灵敏度,动力学上会影响分子扩散速度,改变萃取速率^[5]。一般来说,高萃取温度能降低待测物在液态基质中的扩散系数,加快待测物在液相中的传质速度,缩短达到萃取平衡的时间,但高温同时也会降低 SPME 涂层在固定相和气相之间的分配系数,导致吸附平衡的迁移,同时高温还有可能促进某些待测化合物的

的热解或水解。采用上述萃取条件考察温度对萃取效率的影响,图 2 所示为被测组分在 40 ~ 95 之间不同萃取温度下的分析结果。被测的加标样品组成与图 1 相同,萃取时间 40 min、解析温度 240、解析时间 5 min。除六氯苯和艾氏剂随着萃取温度升高萃取效率降低外,其他被测组分在 60 之前萃取效率随温度的升高而升高,但在 60 之后随着温度的升高萃取效率不断下降,因此,本试验选用 60 作为萃取温度。

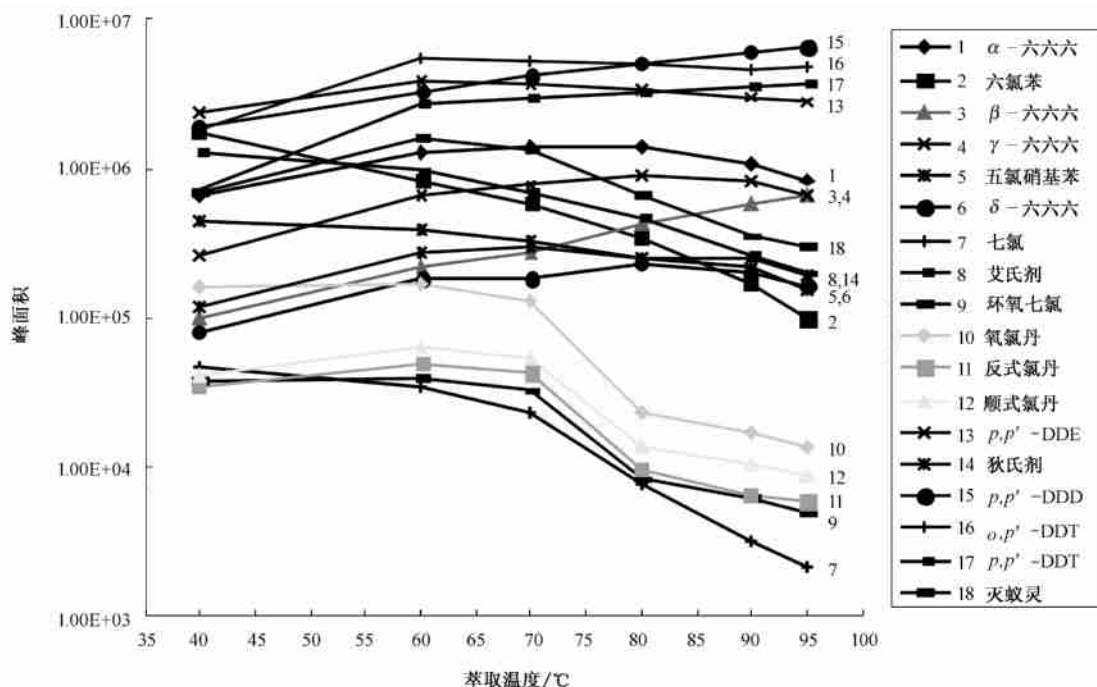


图 2 萃取温度对萃取效率的影响(以峰面积表示)

2.1.3 萃取时间 搅拌速度和萃取温度都能够影响达到萃取平衡所需的时间,所以萃取时间试验在固定萃取温度 60 和搅拌速度 500 r/min 条件下进行。被测的加标样品组成与图 1 相同,萃取温度 60、解析温度 240、解析时间 5 min。萃取 30 min 后,大多数被测组分已获得显著的萃取效率,因此,选择在 60 时萃取 30 min。

2.1.4 解析温度与解析时间 解析时间、萃取头涂层厚度、涂层熔点或分解温度、分配系数和被测物沸点等因素都影响着解析温度的选择。吸附在萃取头涂层上的被分析物在高温下能在短时间内解吸完全,但过高的解析温度会影响萃取头的寿命,且可能导致被分析物及萃取头涂层材料分解。以加标样品考察解析温度对萃取效率的影响,被测的加标样品组成与图 1 相同,萃取温度 60、萃取时间 30 min、解析时间 5 min。解析温度在 200 到 270 之间,结果显示,温度变化对六六六各组分的萃取效率影响不显著;七氯、环氧七氯、氯丹及其异构体、五氯硝基苯、六氯苯随解析温度升高萃取效率逐渐下降;

DDT 各组分随解析温度的增加萃取效率增加,且 240 时解析效率最高。为保证较高的萃取效率和延长萃取头的寿命,选择 240 作为最终解析温度。

采用上述方式萃取的样品在解析温度 240 时,解析 3 min 以上足以使被测物从萃取头上解吸完全,但为保证解吸彻底且不留记忆效应,选择的解吸时间为 7 min。

2.1.5 盐度影响 在样品中加入无机盐能增大基质溶液中的离子强度并降低有机物在基质中的溶解度,从而提高分配系数,增加目标组分的萃取量,进而提高分析的灵敏度^[6]。常用的无机盐有 NaCl、(NH₄)₂SO₄ 和 Na₂CO₃。盐浓度对不同分析物萃取效率的影响不同。本试验中在加标样品中分别加入 0 ~ 1.6 g 的不同量氯化钠,考察被测物的峰面积与盐添加量的关系。被测的加标样品组成与图 1 相同,萃取温度 60、萃取时间 30 min、解析温度 240、解析时间 7 min。结果显示,氯化钠加入量少于 0.5 g, HCH 和 DDT 各组分的萃取效率随盐的加入量增加而增加;氯化钠的加入量少于 0.50 g, 七氯、

环氧七氯、反式氯丹、顺式氯丹、氧氯丹、狄氏剂、艾氏剂、灭蚊灵的萃取效率变化不明显,但是,当氯化钠加入量为0.5 g时,上述各组分萃取效率降低,当氯化钠加入量为0.80 g时,萃取效率下降尤为显著;五氯硝基苯和六氯苯随盐的加入萃取效率下降。为提高多数组分的提取效率,本实验选择添加0.5 g氯化钠。

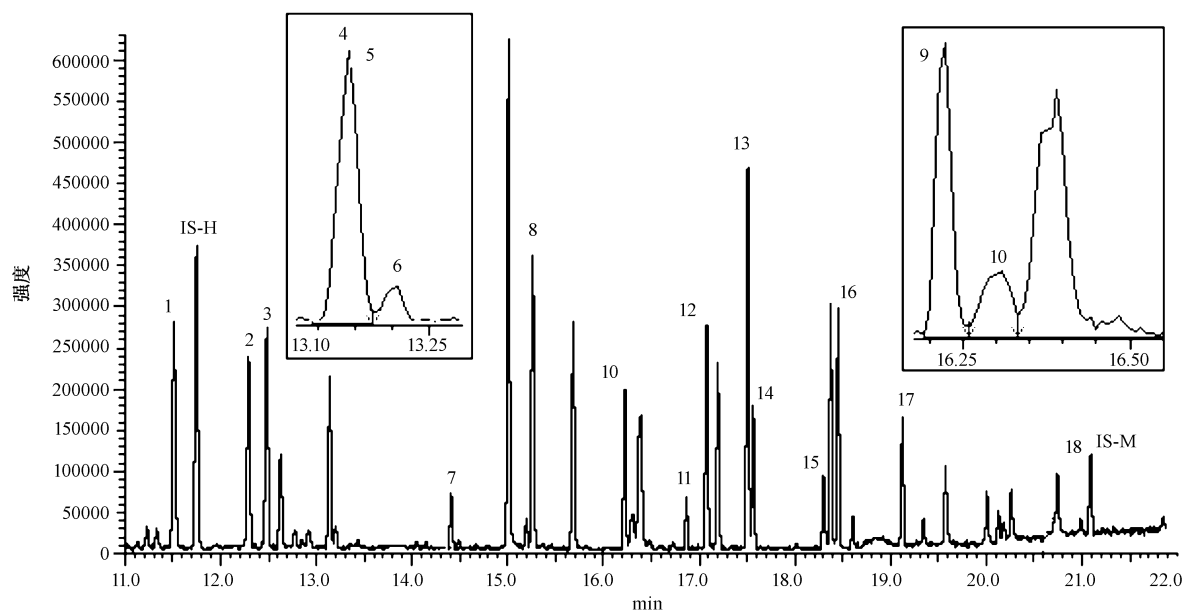
2.2 方法评价实验

2.2.1 线性实验 在优化条件下,测定加标样品系

列溶液,以各系列加标样品溶液的浓度与对应的被测组分和内标的峰面积比进行线性回归计算,得出线性方程(见表1),结果显示,在所选择的浓度范围内,被测的18种有机氯农药组分均显示出较好的线性关系,除五氯硝基苯外,其他被测组分相关系数 $R^2 > 0.99$ 。以3倍噪声峰高对应的浓度作为检出限(LOD),LOD在1~100 ng/kg之间,被测物在MS上响应信号越高,其检出限越低。标准溶液的色谱图如图3所示,加标量为40 μl 。

表1 线性实验结果

编号	有机氯农药组分	保留时间 (min)	定量离子, m/z	线性方程 $y = ax + b$	相关系数 (R^2)	检出限 (ng/kg)
1	- 六六六	11.49	181,183	$y = 0.2273188x - 8.734423e - 003$	0.9975	27
2	- 六六六	12.28	181,183	$y = 5.422668e - 002x - 6.762275e - 003$	0.9942	28
3	- 六六六	12.46	181,183	$y = 0.1214324x - 9.066895e - 004$	0.9969	36
4	- 六六六	13.13	181,183	$y = 2.437688e - 002x + 8.624883e - 004$	0.9973	60
5	六氯苯	13.19	282,284	$y = 0.6096904x + 2.148122e - 002$	0.9943	46
6	五氯硝基苯	13.18	249,251	$y = 2.497871e - 002x - 4.389741e - 003$	0.9577	82
7	七氯	14.39	274,276	$y = 1.457201e - 002x + 9.488691e - 004$	0.9942	25
8	艾氏剂	15.25	263,261	$y = 0.2258132x + 2.533904e - 002$	0.9995	8
9	环氧七氯	16.21	351,353	$y = 4.967957e - 003x + 1.411981e - 003$	0.9910	31
10	氧氯丹	16.21	387,385	$y = 2.720692e - 002x + 6.042602e - 003$	0.9969	26
11	反式氯丹	16.72	377,379	$y = 4.424788e - 003x + 1.751707e - 003$	0.9956	25
12	顺式氯丹	17.05	377,379	$y = 4.857663e - 003x + 1.419725e - 003$	0.9964	19
13	<i>p,p'</i> - DDE	17.49	318,316	$y = 3.350463x + 0.2882922$	0.9963	2
14	狄氏剂	17.55	277,279	$y = 0.6908124x - 0.1189301$	0.9970	33
15	<i>p,p'</i> - DDD	18.36	235,237	$y = 1.677565x + 0.2664806$	0.9922	2
16	<i>o,p'</i> - DDT	18.44	235,237	$y = 3.406313x - 0.4558842$	0.9969	3
17	<i>p,p'</i> - DDT	19.11	235,237	$y = 0.940757x - 0.2200104$	0.9962	5
18	灭蚊灵	21.08	272,274	$y = 0.8267692x + 0.2348092$	0.9992	2
19	^{13}C - 六氯苯	11.72	290,288			
20	^{13}C - 灭蚊灵	21.07	277,279			



出峰顺序与表1一致 (IS-H: $^{13}\text{C}_6$ -六氯苯; IS-M: $^{13}\text{C}_{10}$ -灭蚊灵)

图3 加标样品溶液色谱图

2.2.2 准确度和精密度实验 取空白猪肉样品按优化条件进行加标回收实验,取高低2个加标水平,所加的混合标准应用液分别为20 μ l和10 μ l,平行测定3次,除去五氯硝基苯和氧氟丹,被测组分平均回

收率在90%~120%之间,被测组分3次平行测定的相对标准偏差RSD_{20%},相对标准偏差和回收率满足痕量分析的要求。结果列于表2。

表2 方法评价实验结果

编号	农药组分	加标水平1 (μ g/kg)	测定值 (μ g/kg)	平均回收率 \pm RSD(%)	加标水平2 (μ g/kg)	测定值 (μ g/kg)	平均回收率 \pm RSD(%)
1	-六六六	15	16.9	113.2 \pm 5.5	7.5	8.3	110.1 \pm 4.5
2	-六六六	15	16.5	109.8 \pm 13.8	7.5	7.9	105.3 \pm 12.9
3	-六六六	15	17.1	114.0 \pm 8.2	7.5	8.0	107.1 \pm 4.2
4	-六六六	15	15.3	102.4 \pm 15.6	7.5	8.2	108.7 \pm 17.1
5	六氯苯	17	18.6	109.5 \pm 4.1	8.5	9.2	109.6 \pm 4.6
6	五氯硝基苯	16	9.9	62.0 \pm 9.4	8	7.5	93.0 \pm 29.0
7	七氯	16	16.7	104.2 \pm 5.9	8	9.0	112.3 \pm 8.2
8	艾氏剂	20	23.2	116.2 \pm 9.9	10	12.2	113.4 \pm 0.2
9	环氧七氯	16	17.5	109.4 \pm 4.2	8	8.5	105.0 \pm 7.4
10	氧氟丹	16	12.3	77.0 \pm 16.2	8	8.2	103.0 \pm 31.2
11	反式氯丹	16	14.8	92.4 \pm 14.5	8	8.8	109.6 \pm 7.8
12	顺式氯丹	16	15.1	94.4 \pm 13.5	8	8.5	105.6 \pm 4.0
13	<i>p,p'</i> -DDE	20	21.9	109.7 \pm 9.5	10	9.9	99.3 \pm 7.9
14	狄氏剂	16	18.7	116.7 \pm 5.5	8	7.8	100.6 \pm 11.6
15	<i>p,p'</i> -DDD	20	21.9	109.7 \pm 11.2	10	9.9	98.8 \pm 5.1
16	<i>o,p'</i> -DDT	20	21.7	108.7 \pm 3.7	10	9.9	98.8 \pm 13.8
17	<i>p,p'</i> -DDT	20	22.4	112.1 \pm 6.6	10	10.2	102.0 \pm 11.0
18	灭蚊灵	16	18.0	112.2 \pm 8.1	8	8.6	107.0 \pm 11.0

参考文献

[1] Zolt M, Ralph S. Solid phase microextraction as a tool for trace element determination [J]. Comprehensive Analytical Chemistry, 2003, 41:371-391.
 [2] Mitsushi S, Taizou T. Applicability of headspace solid-phase microextraction to the determination of multi-class pesticides in waters[J]. J Chromatogr. A, 2004, 1028:63-74.
 [3] Dong Chunzhou, Zeng Zhaorui, Li Xiujuan. Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in radish after headspace solid-phase microextraction using calyx arene fiber [J]. Talanta, 2005, 66: 721-727.

[4] Jim éez J J, Bernal J L, del Nozal M J, et al. Sample preparation methods for beeswax characterization by gas chromatography with flame ionization detection [J]. J Chromatogr A, 1998, 829:269-272.
 [5] 张道宁,周志平,汤有志,等.固相微萃取与色谱联用方法分析水中12种有机氯化物[J].分析化学,1999, 27:768-772.
 [6] Li H, Hian K. Determination of pesticides in soil by liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2004, 1038:37-42.

[收稿日期:2006-09-10]

中图分类号:R15;O657.63;TQ450.263;TS251.51 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2006)06-0497-06

